

PCT/JP 2004/013384

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

07.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

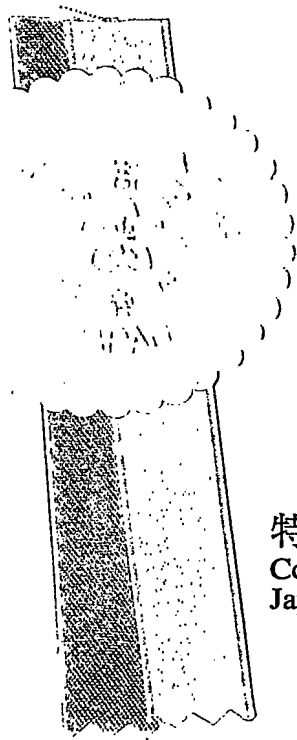
出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   9 月 3 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 3 9 5 2 0  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 3 3 9 5 2 0 ]

出   願   人            富 士 写 真 フ ィ ル ム 株 式 会 社  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

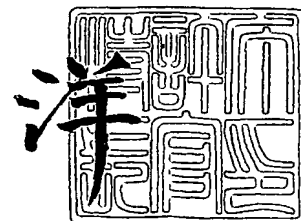
Best Available Copy



特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

2 0 0 5 年   1 月 2 0 日

小 川



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 9 2 7

【書類名】 特許願  
【整理番号】 A31615A  
【提出日】 平成15年 9月30日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/11  
B01D 15/00  
C01B 25/42

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内  
【氏名】 森 寿弘

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内  
【氏名】 半戸 里江

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内  
【氏名】 牧野 快彦

【特許出願人】  
【識別番号】 000005201  
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】  
【識別番号】 110000109  
【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 170347  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0205141

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に、RNAを含む試料溶液中のRNAを吸着及び脱着させる工程を含む、試料溶液からRNAを分離精製する方法。

**【請求項 2】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が、99:1～1:99である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が、90:10～50:50である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相が多孔膜である、請求項 1 から 7 の何れかに記載の方法。

**【請求項 9】**

多孔膜が表裏非対称性の多孔膜である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

多孔膜が平均孔径 0.1～10.0  $\mu\text{m}$  の多孔膜である、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

多孔膜が厚さ 50～500  $\mu\text{m}$  の多孔膜である、請求項 8 から 10 の何れかに記載の方法。

**【請求項 12】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物が非孔性である、請求項 1 から 7 の何れかに記載の方法。

**【請求項 13】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がビーズにコーティングされている、請求項 1 から 7 の何れかに記載の方法。

**【請求項 14】**

ビーズが磁性ビーズである、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

試料溶液が、細胞又はウイルスを含む検体を RNA 可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

RNA 可溶化試薬が、グアニジン塩及び界面活性剤を含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 17】**

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に RNA を吸着させた後、洗浄液を用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着した RNA を脱着せしめうる液を用いて固相に吸着した RNA を脱着させる工程を含む、請求項 1 から 16 の何れか

に記載の方法。

【請求項 18】

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相にRNAを吸着させ、次いで固相にDNA分解酵素溶液を接触させた後、洗浄液を用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着したRNAを脱着せしめうる液を用いて固相に吸着したRNAを脱着させる工程を含む、請求項1から16の何れかに記載の方法。

【請求項 19】

洗浄液が、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn-プロパノールを20～100重量%含む溶液である、請求項17又は18に記載の方法。

【請求項 20】

固相に吸着したRNAを脱着せしめうる液が、塩濃度が0.5M以下の溶液である、請求項17から19の何れかに記載の方法。

【請求項 21】

固相に吸着したRNAを脱着せしめうる工程が、固相に吸着したRNAを脱着せしめる液を加温することなしに、室温で行われる、請求項17から20の何れかに記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも2個の開口を有する容器内にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いてRNAの吸着及び脱着を行う、請求項1から21の何れかに記載の方法。

【請求項 23】

(a) アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いてRNAの吸着及び脱着を行う、請求項1から22の何れかに記載の方法。

【請求項 24】

前記圧力差発生装置が、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

以下の工程を含む、請求項23又は24に記載の方法。

(a) 検体を用いてRNAを含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口に上記のRNAを含む試料溶液を注入する工程、

(b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入したRNAを含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に接触させる工程、

(c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、

(d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した洗浄液を上記他の開口より排出することによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に接触させる工程、

(e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に吸着されたRNAを脱着せしめうる液を注入する工程、

(f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入したRNAを脱着せしめうる液を上記他の開口より排出させることによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に吸着されたRNAを脱着させ、容器外に排出する工程。

【請求項 26】

請求項1から25の何れか記載の方法を行うための試薬キット。

【請求項 27】

請求項1から25の何れかに記載された方法を行う装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸の分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を分離精製する方法に関する。より詳細には、本発明は、DNAとRNAを含む核酸混合物からRNAを分離精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の表面に吸着させ、引き続き洗浄、脱着等の操作によって精製する方法がある（例えば、特公平7-51065号公報）。この方法では、RNAを選択的に分離精製する事が困難である。また、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。

【0006】

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、RNAを含む検体中のRNAを固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させてRNAを分離精製する方法を提供することである。本発明の別の目的は、RNAの分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である固相を使用したRNAの分離精製方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、RNAを固相に吸着及び脱着させる工程を含むRNAの分離精製方法において、前記固相としてアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子を使用し、二個の開口を有する容器内に上記固相を収容した核酸分離精製ユニットを使用することによって、RNAを含む試料溶液からRNAを効率よく分離精製することができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0009】

即ち、本発明によれば、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に、RNAを含む試料溶液中のRNAを吸着及び脱着させる工程を含む、試料溶液からRNAを分離精製する方法が提供される。

## 【0010】

好ましくは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物である。好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比は99:1~1:99であり、さらに好ましくは90:10~50:50である。好ましくは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、又はジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である。

## 【0011】

好ましくは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相は多孔膜である。好ましくは、多孔膜は表裏非対称性の多孔膜である。好ましくは、多孔膜は平均孔径0.1~10.0  $\mu\text{m}$ の多孔膜である。好ましくは、多孔膜は厚さ50~500  $\mu\text{m}$ の多孔膜である。

## 【0012】

好ましくは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物は非孔性である。好ましくは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物はビーズにコーティングされている。好ましくは、ビーズは磁性ビーズである。

## 【0013】

好ましくは、試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体をRNA可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。好ましくは、RNA可溶化試薬は、グアニジン塩及び界面活性剤を含む。

## 【0014】

好ましくは、本発明の方法は、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相にRNAを吸着させた後、洗浄液を用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着したRNAを脱着せしめうる液を用いて固相に吸着したRNAを脱着させる工程を含む。好ましくは、本発明の方法は、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相にRNAを吸着させ、次いで固相にDNA分解酵素溶液を接触させた後、洗浄液を用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着したRNAを脱着せしめうる液を用いて固相に吸着したRNAを脱着させる工程を含む。

## 【0015】

好ましくは、洗浄液は、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn-プロパノールを20~100重量%含む溶液である。好ましくは、固相に吸着したRNAを脱着せしめうる液は、塩濃度が0.5M以下の溶液である。好ましくは、固相に吸着したRNAを脱着せしめうる工程は、固相に吸着したRNAを脱着せしめる液を加温することなしに、室温で行われる。

## 【0016】

好ましくは、少なくとも2個の開口を有する容器内にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いてRNAの吸着及び脱着を行う。好ましくは、(a)アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相、(b)前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c)前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いてRNAの吸着及び脱着を行う。好ましくは、前記圧力差発生装置は、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている。

## 【0017】

好ましくは、本発明の方法は以下の工程を含む。

(a) 検体を用いてRNAを含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口に上記のRNAを含む試料溶液を注入する工程、

(b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入したRNAを含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に接触さ

せる工程、

(c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、

(d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した洗浄液を上記他の開口より排出することによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に接触させる工程、

(e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に吸着されたRNAを脱着せしめうる液を注入する工程、

(f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入したRNAを脱着せしめうる液を上記他の開口より排出させることによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に吸着されたRNAを脱着させ、容器外に排出する工程。

#### 【0018】

本発明の別の側面によれば、上記した本発明の方法を行うための試薬キットが提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の方法を行う装置が提供される。

#### 【発明の効果】

#### 【0019】

RNAの分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である固相を用いた本発明のRNAの分離精製方法により、DNAとRNAを含む核酸混合物からRNAを分離精製することができる。更に、本明細書に記載した核酸分離精製ユニットを使用することにより、操作が容易となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0020】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明の核酸の分離精製方法は、RNAを含む試料溶液からRNAを分離精製する方法に関するものであり、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に、RNAを含む試料溶液中のRNAを吸着及び脱着させる工程を含むことを特徴とする。本発明で用いるRNAを含む試料溶液中のRNAの長さは特に限定されない。

#### 【0021】

固相として使用するアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子としては、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の何れでも良いが、特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物が好ましい。

#### 【0022】

アセチルセルロースの混合物中の各アセチルセルロースの混合比は本発明の効果が達成できる限り特に限定されない。例えば、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を使用する場合、その混合比は一般的には、99:1~1:99であり、好ましくは90:10~50:50である。

#### 【0023】

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の表面積を大きくするためには、膜化することが好ましい。また、アセチルセルロースは多孔膜でも非孔性膜でもよいが、膜を多孔性とするのが更に好ましい。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相が多孔膜である場合、さらに好ましくは、該多孔膜は表裏非対称性の多孔膜とすることができる。好ましくは、多孔膜は、平均孔径0.1~10.0  $\mu\text{m}$ の多孔膜である。また好ましくは、多孔膜は厚さ50~500  $\mu\text{m}$ の多孔膜である。

#### 【0024】

また、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物はビーズにコーティングされて

いてもよい。この場合、ビーズは磁性ビーズを用いてもよい。例えばポリエチレン製のビーズの表面にトリアセチルセルロースの膜を形成してもよい。この場合、トリアセチルセルロースはビーズにコーティングされることになる。ビーズの素材は、核酸を汚染等しなければよく、ポリエチレンには限定されない。

#### 【0025】

本発明では、上記したようなアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子から成る固相、好ましくはアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子を固相として用い、該固相にRNAを含む試料溶液中のRNAを吸着及び脱着させることにより、試料溶液からRNAを分離精製することができる。上記したようなアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子から成る固相を用いることによってRNAを分離精製できることは従来報告がなく、本発明者らにより今回初めて明らかにされたことである。

#### 【0026】

本発明のRNAの分離精製方法では、好ましくは、少なくとも2個の開口を有する容器内にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

#### 【0027】

さらに好ましくは、(a) アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いてRNAの吸着及び脱着を行うことができる。

#### 【0028】

この場合の本発明の核酸の分離精製方法の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

(a) 検体を用いてRNAを含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口に上記の核酸を含む試料溶液を注入する工程、

(b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入したRNAを含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に接触させる工程、

(c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、

(d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した洗浄液を上記他の開口より排出することによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に接触させる工程、

(e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に吸着されたRNAを脱着せしめうる液を注入する工程、

(f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入したRNAを脱着せしめうる液を上記他の開口より排出させることによって、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に吸着されたRNAを脱着させ、容器外に排出する工程。

#### 【0029】

アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子を用いたRNAの分離精製方法についてさらに具体的に説明する。本発明では、好ましくは、RNAを含む試料溶液をアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子から成る固相に接触させることにより試料溶液中のRNAを固相に吸着させ、次いで、固相に吸着させたRNAを、以下に説明する好適な溶液を用いて固相から脱着させる。さらに好ましくは、RNAを含む試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を細胞膜を溶解する溶液で処理することによりRNAを液中に分散させた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。

## 【0030】

本発明において使用できるRNAを含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

## 【0031】

最初にこれらの検体を、細胞膜を溶解してRNAを可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜が溶解されて、RNAが水溶液内に分散する。細胞膜の溶解および核酸の可溶化のためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、1)赤血球の除去、2)各種タンパク質の除去、及び3)白血球の溶解が必要となる。1)赤血球の除去および2)各種タンパク質の除去は、固相への非特異吸着および多孔膜の目詰まりを防ぐために、3)白血球の溶解は、抽出の対象であるRNAを可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、3)白血球の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程でRNAを可溶化することが必要である。こうして得られたRNAを含む試料溶液には、DNAも含まれている。

## 【0032】

本発明で用いるRNA可溶化試薬としては、グアニジン塩、界面活性剤を含む溶液が挙げられる。

グアニジン塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のグアニジン塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。グアニジン塩の溶液中の濃度は、0.5M以上6M以下 好ましくは 1M以上5M以下である。

## 【0033】

界面活性剤としてはTriton-X100を使用することができるが、この他にも、SDS、コール酸ナトリウム又はサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、Tween20又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオクチオルフェニルエーテル（Triton-X100）等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤の溶液中の濃度は、通常0.05重量%～10重量% 特に好ましくは0.1重量%～5重量%である。

## 【0034】

このようにRNAが分散した溶液中に、水溶性有機溶媒を添加して、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子と接触させる。この操作により、試料溶液中のRNAがアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子に吸着される。本明細書中上記した操作で可溶化されたRNAを、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子から成る固相に吸着させるためには、RNAが可溶化した溶液に水溶性有機溶媒を混合することが必要である。

## 【0035】

ここで用いる水溶性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノール又はプロパノールなどが挙げられ、中でもエタノールが好ましい。水溶性有機溶媒の濃度は、好ましくは5重量%～90重量%であり、さらに好ましくは20重量%～60重量%である。エタノールの添加濃度は、凝集物を生じない程度でできるだけ高くすることが特に好ましい。

## 【0036】

得られたRNAを含む試料溶液中に存在する塩としては、各種カオトロピック物質（グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム）や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化アンモニウム等が好ましい。特にグアニジウム塩は、細胞膜の溶解の効果を併有するので特に好ましい。

## 【0037】

次いで、このRNAが吸着したアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子を洗浄液に接触させる。この溶液はRNAと一緒にアセチル価の異なるアセ

チルセルロースの混合物から成る有機高分子に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子からRNAは脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。洗浄液は主剤と緩衝剤を含む水溶液からなる。主剤としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、ブタノール、アセトン等の約10～100重量%（好ましくは約20～100重量%、さらに好ましくは約40～80重量%）の水溶液が挙げられる。

#### 【0038】

次に、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子に吸着したRNAを脱着せしめうる溶液に、上記洗浄後のアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子を接触させる。この接触させた溶液には目的とするRNAが含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばRT-PCR（逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応）によるRNAの増幅に提供する。RNAを脱着せしめうる溶液としては、塩濃度が低いことが好ましく、特に好ましくは0.5M以下の塩濃度の溶液を使用する。この溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

#### 【0039】

本発明で使用する核酸分離精製ユニットは、少なくとも2個の開口を有する容器内にアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットである。

#### 【0040】

容器の材料に特別な限定はなく、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子が収容でき、かつ少なくとも2個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。例えば、ポリスチレン、ポリメタアクリル酸エステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリカーボネート等の透明あるいは不透明の樹脂を用いるのが好ましい。

#### 【0041】

上記容器に収容されるアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の形状にも特別な限定は無く、円形、正方形、長方形、楕円、膜の場合には筒状、巻物状、あるいはアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子をコーティングしたビーズ等、任意の形状でよいが、製造適性の点からは、円、正方形、円筒状、巻物状等の対称性の高い形状及びビーズが好ましい。

#### 【0042】

圧力差発生装置としては、注射器、ピペッタ、あるいはペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等が挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペッタは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている。以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0043】

##### 実施例1

##### (1) 核酸分離精製容器の作成

内径7mm、核酸吸着用の固相を収容する、2つの開口を有する核酸精製用容器をハイインパクトポリスチレンで作成する。

##### (2) 核酸分離精製ユニット

核酸吸着固相として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔膜（平均孔径=1.2 $\mu$ m、膜厚=70 $\mu$ m）を作成する。この多孔膜を上記(1)で作成した核酸精製用容器の核酸吸着固相収納部に収容し、核酸分離精製ユニットとする。

#### 【0044】

##### (3) RNA可溶化試薬及び洗浄液の調製

表1に示す処方のRNA可溶化試薬及び洗浄液を調製する。

【0045】

【表1】

(RNA可溶化試薬)

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| 塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製) | 382 g   |
| Tris (ライフテクノロジー社製)    | 12.1 g  |
| Triton-X100 (ICN製)    | 10 g    |
| 蒸留水                   | 1000 ml |

(洗浄液)

10mM Tris-HCl 65%エタノール

【0046】

#### (4) 核酸精製操作

ガン化人骨髄細胞 (HL60) 培養液を用意する。この培養液を細胞数が $1 \times 10^6$ 個になるよう採取し $300 \times g$  5分遠心にて細胞を沈殿させ上澄みを除き細胞を得る。上記HL60細胞 ( $1 \times 10^6$ ヶ) にRNA可溶化試薬溶液  $200 \mu l$  を添加して攪拌、続いてエタノール  $200 \mu l$  を加え、攪拌することでRNAを含む試料溶液を作成する。該RNAを含む試料溶液を、上記(1)及び(2)で作成したアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の多孔膜を有する核酸精製ユニットの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製ユニット内を加圧状態にし、注入したRNAを含む試料溶液を、上記多孔膜に通過させることで、上記性多孔膜に接触させ、核酸分離精製ユニットの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製ユニットの上記一の開口に洗浄液を注入し、上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製ユニット内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製ユニットの上記一の開口に回収液を注入し、核酸分離精製ユニットの上記一の開口に圧力差発生装置を結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収した。

【0047】

また、比較例として、実施例で使用したトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔膜 (平均孔径 =  $1.2 \mu m$ 、膜圧 =  $70 \mu m$ ) の代わりに、ガラスフィルター (シリケゲルフィルター、膜圧 =  $1000 \mu m$ ) を使用する以外は、上記と同様にRNAの分離性実験を行った。

【0048】

#### (5) RNAの分離精製の確認

回収液を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。上記した本発明の実施例と比較例で得られた回収液を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。その結果を図1に示す。図1の結果から分かるように、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子からなる固相にRNAを吸着させることにより、RNAを選択的に回収できるのに対し、比較例の方法ではDNAが混在していることが判明した。

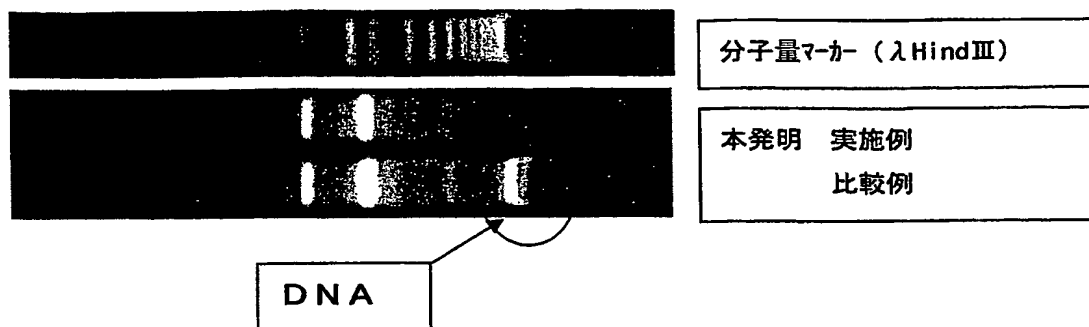
【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】 図1は、本発明の実施例及び比較例に従ってRNAを含む試料溶液から精製したRNAの電気泳動の結果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 RNAを含む検体中のRNAを固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させてRNAを分離精製する方法を提供すること。

【解決手段】 アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の固相に、RNAを含む試料溶液中のRNAを吸着及び脱着させる工程を含む、試料溶液からRNAを分離精製する方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 3 9 5 2 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 5 2 0 1 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名 富士写真フイルム株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/013384

International filing date: 08 September 2004 (08.09.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-339520  
Filing date: 30 September 2003 (30.09.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**